製品コード RR139A

検便検査用

TaKaRa

TaKaRa 腸管系病原細菌遺伝子検出キット

説明書

v201510Da

本製品は、検便検体から PCR により、腸管出血性大腸菌（EHEC）、サルモネラ、赤痢菌の遺伝子を検出するキットです。検出対象遺伝子は、VT 遺伝子（EHEC）、*invA* 遺伝子（サルモネラ）、*ipaH* 遺伝子（赤痢菌）で、PCR 阻害の有無を確認するためのインターナルコントロールも同時に検出します。
各 PCR 増幅産物の検出には融解曲線分析を用いるので、リアルタイム PCR 装置を使用して PCR 増幅～融解曲線分析を行うのが便利です。

特長

- 高速 PCR 試薬の採用により、約 1 時間で結果が得られます。
- EHEC、サルモネラ、赤痢菌の 3 菌種をマルチプレックス PCR により 1 反応で検出します。
- PCR 増幅産物は SYBR® Green I を用いた融解曲線分析で検出するため、電気泳動等によるコンタミネーションの危険性が低い方法です。Tm 値の違いにより増幅した菌種を推定します。

【検出対象遺伝子】

検出対象菌種	検出対象遺伝子	Tm 値＊
EHEC	VT1/2 遺伝子	79.5 ～ 81.5℃
サルモネラ属菌	*invA* 遺伝子	82.8 ～ 84.8℃
赤痢菌	*ipaH* 遺伝子	84.6 ～ 86.6℃
（PCR 阻害の有無の確認）	インターナルコントロール	72.1 ～ 74.1℃

＊：Thermal Cycler Dice® Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）で測定した場合の参考値です。リアルタイム PCR 装置の機種や PCR 産物の増幅量等により、Tm 値が前後する場合があります。

I. キットの内容（200 回分）

【TaKaRa 腸管系病原細菌遺伝子検出キット（PCR 試薬）（製品コード RR138A）＊1】

1.	Reaction Mix Fast＊2	2 ×	1.25 ml × 2 本
2.	100 × SYBR Green I＊3		50 μl
3.	Primer Mix (VT/ipaH/invA)	5 ×	1 ml
4.	dH_2O		1 ml × 2 本

【TaKaRa 腸管系病原細菌遺伝子検出キット（Positive Control）（製品コード 6993A）＊1】

1.	VT Positive Control＊4	50 μl
2.	ipaH Positive Control＊4	50 μl
3.	invA Positive Control＊4	50 μl

＊1：単品での販売は行っておりません。
＊2：反応に必要な dNTP Mixture、Mg^{2+}、酵素等を含む。
＊3：遮光に留意すること。
＊4：他の試薬へのコンタミネーションに留意すること。

II. 保存

－20℃（輸送、保存とも）

III. キット以外に必要な器具、機器（主なもの）

【器具】

・200 μl、20 μl、10 μl　各マイクロピペット
・マイクロピペット用チップ（疎水性フィルター付）

【機器】

・微量高速遠心機
・ヒートブロック等（95℃、5 分の熱処理に使用）
・リアルタイム PCR 装置
Thermal Cycler Dice Real Time System III（製品コード TP950/TP970/TP980）
Thermal Cycler Dice Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760）
CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System（BIO-RAD 社）
StepOnePlus Real-Time PCR System（Life Technologies）　等

IV. 使用に際して

本キットを使用する際の注意事項です。**使用前に必ずお読みください。**

1. 使用目的：本キットは検便検査に使用する製品です。

2. 測定結果：本キットは遺伝子検出であるため、不活化された細菌も検出されます。（検査結果判定により発生する問題に関して、タカラバイオ株式会社は一切の責任を負いません。）

3. 廃棄：　試料は感染性を有するものとして、各施設の安全規定に従って廃棄してください。作業区域は常に清潔に保ち、検体または検査に用いた器具等は高圧蒸気滅菌器を用いて 121℃で 20 分間以上加熱滅菌処理、または次亜塩素酸ナトリウム液で処理を行った上、各施設の感染性廃棄処理マニュアルに従って処理してください。試薬を廃棄する際は多量の水で流してください。プラスチックなどの試薬容器ならびに器具は、廃棄物の処理および清掃に関する法律に従って処理してください。

V. 操作上の注意

1. Reaction Mix Fast を使用する際には、泡立てないよう穏やかに転倒混和し、試薬を均一にしてから使用してください。試薬が完全に混和されていない場合、十分な反応性が得られなくなります。ボルテックスによる混合は行わないでください。なお、保存中に沈殿を生じた場合には、軽く手で温めるか室温にしばらく置いた後、転倒混和することで完全に溶解します。必ず均一に混合してからご使用ください。

2. 100 × SYBR Green I は、軽く手で温めるか室温にしばらく置いた後、よく混合してから使用してください。氷上に置くと固化するため、反応液調製までは遮光して室温に置いてください。

3. 試薬の分注を行うときは、必ず新しいディスポーザブルチップを用い、サンプル間のコンタミネーションを防止してください。

4. 万一、サンプルやプライマーが核酸分解酵素（ヌクレアーゼ）の混入により分解されると、正確な検出ができません。実験者の汗や唾液からもヌクレアーゼが混入する可能性がありますので、作業過程ごとにディスポーザブルの手袋着脱およびマスク着用など、操作には細心の注意を払ってください。

5. 反応液の調製から検出まで、次の 3 エリアを設定し、物理的に隔離することを推奨します。各エリアにおいては、増幅産物の入ったチューブの開閉は避けてください。

   ○エリア 1：反応液の調製、分注を行います。
   ○エリア 2：検体の調製を行います。
   ○エリア 3：検体の反応液への添加と、反応および検出を行います。

   本キットでは増幅反応後に融解曲線分析で検出を行うため、反応終了後の増幅産物を電気泳動などで解析する必要はありません。実験室内の核酸のコンタミネーション発生の原因となりますので、増幅産物をチューブから取り出すことはおやめください。

6. リアルタイム PCR 装置の取扱いは、それぞれの装置の取扱説明書に従ってください。

7. 本キットはリアルタイム PCR 装置での解析によって結果判定を行うのが便利です。リアルタイム PCR 補正機能などが適正に作動しない場合、誤判定の原因になります。必要に応じてリアルタイム PCR 装置の取扱説明書に従い、Manual 設定を行ってください。

VI. 操作

【コントロール反応について】
結果の判定を正しく行うため、以下のコントロール反応を同時に行ってください。

陰性コントロール
PCR 反応の際に、本製品の dH_2O を鋳型とした反応を「陰性コントロール」として実施します。

陽性コントロール
PCR 反応の際に、本製品の VT Positive Control、ipaH Positive Control、invA Positive Control を鋳型とした 3 反応を「陽性コントロール」として実施します。

1. 前処理（エリア 2 で実施）

1）便検体懸濁液（5 ～ 10%）を 1.5 ml チューブに 100 μl 分取する。*
2）95℃、5 分の熱処理を行う。
3）8,000 ～ 15,000 rpm で 5 分間遠心する。

遠心後、上清を PCR の鋳型として使用する（2. PCR 増幅のステップ 2）。

【注意】前処理後のサンプルは保存できません。

＊：95℃、5 分の熱処理が可能であれば、他の容器・容量でも問題ありません。

2. PCR 増幅

1）以下の反応液を氷上で調製する。（エリア 1 で実施）
必要数＋α分の反応液をまとめて調製し、リアルタイム PCR 用チューブに 23 μl ずつ分注する。必要本数は、サンプル数＋ 4 本（陽性コントロール 3 種類、陰性コントロールとして dH_2O を加えたもの）と設定する。

（1 反応分の反応液）

Reaction Mix Fast	12.5 μl
100 × SYBR Green I	0.25 μl
Primer Mix (VT/ipaH/invA)	5 μl
dH_2O	5.25 μl
Total	23 μl

2）前処理済のサンプル（または各種 Positive Control または dH_2O）を 2 μl 添加する。（エリア 3 で実施）

【注意】反応液調製後は速やかに反応を開始してください。

3）以下の条件で反応を実施する。

◆ Thermal Cycler Dice Real Time System III の場合

Speed：Fast（Normal から Fast に変更）

＜初期変性＞
94℃　30 秒

＜ PCR：45 サイクル＞
90℃　1 秒
64℃　9 秒（蛍光検出：SYBR Green I）

＜融解曲線分析（68 ～ 90℃）＞

◆ Thermal Cycler Dice Real Time System *II*、*Lite* の場合

Speed：Fast（デフォルト設定から変更なし）

＜初期変性＞
94℃　30 秒

＜ PCR：45 サイクル＞
90℃　1 秒
64℃　1 秒＊

＜融解曲線分析（68 ～ 90℃）＞

＊：64℃、1 秒のステップでは蛍光検出を行う必要はありません。
なお、蛍光検出を外しても 1 秒の設定ができない機種は使用できません。

◆ CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System、StepOnePlus Real-Time PCR System の場合

＜初期変性＞
94℃　30 秒

＜ PCR：45 サイクル＞
90℃　1 秒
64℃　10 秒（蛍光検出：SYBR Green I）

＜融解曲線分析（68 ～ 90℃）＞

3. 判定

融解曲線分析で得られた Tm 値より判定を行います。融解曲線分析で求められる検出対象遺伝子の Tm 値は、リアルタイム PCR の機種等によって変動する可能性がありますので、同時に反応を行った陽性コントロールの Tm 値と比較して未知サンプルの判定を行ってください。

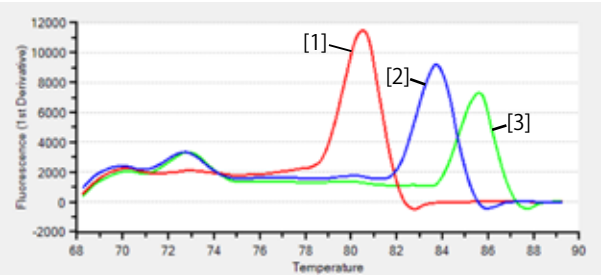
【検出対象遺伝子と Tm 値】

検出対象菌種	検出対象遺伝子	Tm 値*
EHEC	VT1/2 遺伝子	79.5 ～ 81.5℃
サルモネラ属菌	*invA* 遺伝子	82.8 ～ 84.8℃
赤痢菌	*ipaH* 遺伝子	84.6 ～ 86.6℃
（PCR 阻害の有無の確認）	インターナルコントロール (IC)	72.1 ～ 74.1℃

＊：Thermal Cycler Dice Real Time System *II* で測定した場合の参考値です。リアルタイム PCR 装置の機種や PCR 産物の増幅量等により、Tm 値が前後する場合があります。

【コントロール反応の確認】

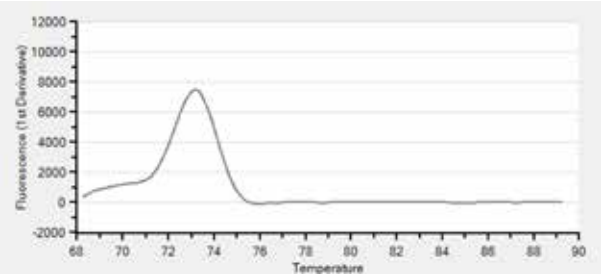
＜陽性コントロールの反応例：融解曲線分析＞



[1]（赤）：VT Positive Control
[2]（青）：invA Positive Control
[3]（緑）：ipaH Positive Control

- 78 ～ 88℃の範囲に各検出対象遺伝子の明確なピークがあることを確認します。
- 73℃付近のピークは、インターナルコントロールの増幅産物です。

＜陰性コントロールの反応例：融解曲線分析＞



- 73℃付近にインターナルコントロールのピークがあることを確認します。
- 78 ～ 88℃の範囲にピークがないことを確認します。

＜正しい反応結果とトラブルシューティング＞

	PCR の鋳型	IC	VT	invA	ipaH
陽性コントロール	VT Positive Control	＋／－	＋	－	－
	invA Positive Control	＋／－	－	＋	－
	ipaH Positive Control	＋／－	－	－	＋
陰性コントロール	dH_2O	＋	－	－	－

・陽性コントロールで目的の遺伝子が検出されない場合は、何らかの原因で PCR 反応や検出が正常に行われていない。再反応を行う。
・陰性コントロールで VT、*invA*、*ipaH* 遺伝子が検出された場合は、コンタミネーションの疑いがある。反応液の調製場所や器具類を除染したうえで再反応を行う。

【測定対象サンプルの判定】

＜陽性判定の例＞

IC	VT	invA	ipaH	判定
＋／－	＋	－	－	EHEC 陽性
＋／－	－	＋	－	サルモネラ属菌陽性
＋／－	－	－	＋	赤痢菌陽性

VT、*invA*、*ipaH* 遺伝子が検出された場合は、IC の検出の有無に関わらず、陽性判定となる。

＜陰性検体の例＞

IC	VT	invA	ipaH	判定
＋	－	－	－	検出限界以下
－	－	－	－	判定不能

・VT、*invA*、*ipaH* 遺伝子が共に検出されなかった場合には、IC の結果を確認する。
・IC が検出されていれば、検出限界以下判定となる。
・IC が不検出の場合は、PCR 阻害の疑いがある。サンプルを希釈するか、DNA 精製を行って再測定する。

※ 77℃付近（IC と VT の間）に非特異的なピークが生じることがありますが、（VT、invA、ipaH のピークがなければ）「－」と判定します。
※ 増幅配列内に変異が存在する場合、サンプルの Tm 値と陽性コントロールの Tm 値との間に少し差が生じることがあります。

VII. 関連製品

Thermal Cycler Dice® Real Time System III（製品コード TP950/TP970/TP980）
Thermal Cycler Dice® Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
Thermal Cycler Dice® Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760）

［TP950 用消耗品］
0.1 ml 8-strip tube, individual Flat Caps（製品コード NJ902）
0.1 ml 8-strip tube & cap Set（製品コード NJ903）

［TP900、TP700 用消耗品］
0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps（製品コード NJ600）
0.2 ml Hi-8-Tube（製品コード NJ300）
0.2 ml Hi-8-Flat Cap（製品コード NJ302）

VIII. 注意

- 本製品は、検便検査用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の、SYBR は Molecurar Probes, Inc. の登録商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-565-6999　Fax 077-565-6995
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

タカラバイオ株式会社

v201510Da